

## DAYA ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL TUNAS BAMBU APUS TERHADAP BAKTERI *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* SECARA IN VITRO

### ANTIBACTERIAL ACTIVITY THE BAMBU APUS SHOOT OF *Escherichia coli* DAN *Staphylococcus aureus* IN VITRO

Evi Kurniawati

#### Info Artikel

##### Sejarah Artikel :

Diterima 4 November 2015  
Disetujui 20 November 2015  
Dipublikasikan 16 Desember 2015

##### Kata Kunci:

Tunas bambu apus, energi antibakteri, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*

##### Keywords :

*Bamboo Apus Shoot, Antibacterial Energy, Escherichia coli and Staphylococcus aureus*

#### Abstrak

**Latar belakang:** Penyakit infeksi bisa disembuhkan dengan pengobatan tradisional, salah satu contoh tanaman yang memiliki daya antibakteri yaitu tunas bambu apus. **Tujuan:** Menguji daya antibakteri dari ekstrak etanol tunas bambu apus terhadap bakteri *Escherichia coli* mewakili bakteri Gram negatif (-) dan *Staphylococcus aureus* mewakili bakteri Gram positif (+). **Metode:** Ekstrak etanol tunas bambu apus didapatkan dari hasil maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 70%. Selanjutnya ekstrak etanol yang diperoleh dibuat pengenceran konsentrasi 12,5 mg/ml, 25 mg/ml, 50 mg/ml, 100 mg/ml dan 150 mg/ml. Metode yang digunakan adalah metode difusi kertas cakram NA (Natrium agar). Aktivitas antibakteri ditunjukkan oleh adanya kadar hambat minimum (KHM) yang terbentuk dan dilakukan uji kualitatif untuk membuktikan senyawa yang berkhasiat sebagai antibakteri. **Hasil:** Hasil uji kualitatif yang diduga sebagai antibakteri adalah saponin dan flavonoid. Data hasil uji antibakteri dianalisa statistika dengan menggunakan Anova satu arah (One way) dilanjutkan dengan uji kruskal walis. **Kesimpulan:** Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol tunas bambu apus mempunyai daya antibakteri terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* dengan konsentrasi 150 mg/ml

#### Abstract

**Background:** The infection disease be able to cure by traditional medication that is plants, and one of the plants that has antibacterial activity is Bamboo Apus Shoot. **Objective:** To test antibacterial power from ethanolic bamboo apus shoot extract to *Escherichia coli* bacterial which represented gram negative (-) and *Staphylococcus aureus* which represented gram positive bacteria. **Method:** To gel ethanolic extract of bamboo shoot is being done maseration by using ethanol solvent 70%. Then ethanolic extract which gotten is made dilution by 12,5mg/ml, 25 mg/ml, 50 mg/ml, 100 mg/ml, and 150 mg/ml concentration, Ampicyllin as positive control and aquadest steriliac as negative control. Method which used is paper disc diffusion method by scratching bacteria into the plate which has given NA (Natrium Agar). Bacteria activity showed by there a minimum inhibit level which created and did qualitative test to approve compounds are effecius as antibacterial. **Result:** qualitative test which supposed as antibacterial are saponins and flavonoid. Result data of bacterial test is statistic analyzed by using one way continued with kruskal walis test. **Conclusion:** this research has showed that ethanolic bamboo shoot extract have antibacterial activity to *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* with 150 mg/ml concentration.

#### Korespondensi :

Mahasiswa Pascasarjana Analisa Farmasi Universitas Airlangga Surabaya . E-mail: [evi8890@yahoo.co.id](mailto:evi8890@yahoo.co.id)

## PENDAHULUAN

Masyarakat Indonesia sejak zaman dahulu sudah mengenal dan memakai tumbuhan yang berkhasiat sebagai obat, salah satu upaya penanggulangan masalah kesehatan yang dihadapi. Tunas bambu merupakan salah satu jenis sayuran yang sudah lama dikenal dikonsumsi manusia dan tumbuhan yang oleh sebagian masyarakat dipercaya berkhasiat sebagai obat.

Tunas bambu memiliki tekstur renyah<sup>1</sup>. Kandungan yang terdapat dalam tunas mengandung saponin, daunnya mengandung flavonoid dan polifenol<sup>2</sup>. Tunas bambu apus berkhasiat untuk menyembuhkan demam dan peluruh air seni<sup>2</sup>.

*Escherichia coli* adalah kuman yang banyak ditemukan di dalam usus besar manusia sebagai flora normal, sifatnya unik dapat menyebabkan infeksi pada usus misalnya diare pada anak dan travelersdiarrhea, infeksi saluran kemih, meningitis pada bayi baru lahir seperti juga kemampuannya menimbulkan infeksi pada jaringan tubuh lain di luar usus<sup>3</sup>.

*Staphylococcus aureus* merupakan bentuk koagulase positif, hal ini membedakan dari spesies lain *Staphylococcus aureus* merupakan patogen utama bagi manusia dan setiap orang akan mengalami beberapa tipe infeksi *Staphylococcus aureus* sepanjang hidupnya, bervariasi beratnya mulai dari keracunan makanan atau infeksi kulit<sup>4</sup>.

## METODE PENELITIAN

Penelitian ini meliputi uji aktivitas antibakteri dari ekstrak etanol tunas bambu apus serta skrining fitokimianya. Metode penelitian yang digunakan adalah metode eksperimental parametrik, sedangkan rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 7 perlakuan dan setiap perlakuan terdiri atas 5

ulangan. Parameter yang diukur adalah aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* secara mikrobiologi dengan metode difusi agar, kemudian daya hambat (zona jernih) diukur dengan jangka sorong.

Pembuatan ekstrak dilakukan dengan menggunakan prosedur sebagai berikut. Penyarian dilakukan dengan pelarut etanol 70%. Ditimbang 200 gram serbuk tunas bambu apus direndam 1500 ml etanol 70% dan dilakukan pengadukan secara kontinyu, pada hari ke-2 disaring. Hasil saringan ditampung dan disimpan (Filtrat A). Ampas direndam kembali dengan 500 ml etanol 70%, setelah hari ke-5 disaring dan hasil. Saringan ditampung di (filtrat B), sedangkan ampas dibuang. Filtrat A dan B ditampung dalam satu wadah kemudian diuapkan di rotary evaporator hingga diperoleh ekstrak encer.

Pemeriksaan bebas etanol dalam ekstrak tunas bambu apus dilakukan dengan menggunakan prosedur sebagai berikut. Ekstrak ditambah dengan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (p) lalu ditambah lagi dengan CH<sub>3</sub>COOH, lalu panaskan. Hasil uji negatif bila tidak tercium bau khas ester<sup>5</sup>.

Pembuatan larutan uji dalam penelitian ini menggunakan prosedur sebagai berikut. Larutan uji dibuat 12,5 mg/ml; 25 mg/ml; 50 mg/ml; 100 mg/ml; dan 150 mg/ml dengan cara ditimbang 125 mg, 250 mg, 500 mg, 1000 mg, dan 1500 mg, kemudian masing-masing ekstrak dilarutkan dalam 10 ml aquades.

Pembuatan media dilakukan dengan menggunakan prosedur sebagai berikut. Nutrien Agar (NA) sebanyak 4,2 gram dilarutkan dalam 15 ml aquades pada erlenmeyer dipanaskan hingga mendidih dan didapatkan warna kuning kecoklatan agak

kental jernih. Media disterilkan di autoclave mulai dingin (belum menjadi agar) dituang pada beberapa plate.

Inokulasi bakteri dilakukan dengan menggunakan prosedur sebagai berikut. Bakteri uji diambil dengan jarum ose steril, lalu ditanamkan pada media agar miring dengan cara menggore, selanjutnya diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam. Perlakuan yang sama dilakukan pada setiap jenis bakteri uji. Bakteri uji yang telah diinokulasi diambil dengan kawat ose steril lalu disuspensikan kedalam tabung yang berisi 2 ml larutan NaCl 0,9%. Uji aktivitas antibakteri dengan metode Kirby bauer.

Pengujian golongan senyawa aktif berupa uji flavonoid, uji saponin, dan uji polifenol. Adanya senyawa flavonoid sampel ditunjukkan oleh terbentuknya warna merah kuat atau violet setelah sampel dilarutkan dalam etanol dan ditambah HCl pekat. Senyawa saponin ditunjukkan dengan terbentuknya buih yang tidak menghilang selama 30 menit setelah sampel dikocok. Adanya senyawa polifenol, yaitu tannin,

dengan suhu 121oC selama 15 menit, bila ditunjukkan oleh terbentuknya endapan apabila filtrat sampel ditambah garam gelatin. Apabila filtrat sampel ditambah pereaksi FeCl<sub>3</sub> dan menunjukkan warna hijau kecoklatan maka menunjukkan adanya tannin terkondensasi dan terbentuk warna selain wana ini menunjukkan adanya senyawa polifenol<sup>6</sup>.

### HASIL PENELITIAN

Hasil ekstraksi yang diperoleh dalam penelitian ini awalnya diuji adanya etanol. Uji bebas etanol dilakukan untuk membebaskan ekstrak dari etanol sehingga didapatkan ekstrak yang murni tanpa ada kontaminasi, selain itu etanol sendiri bersifat sebagai antibakteri dan antifungi sehingga tidak akan menimbulkan positif palsu pada perlakuan sampel. Hasil uji bebas etanol ekstrak tunas bambu apus menunjukkan bahwa ekstrak tersebut bebas etanol sehingga dapat disimpulkan bahwa diperoleh ekstrak yang dapat digunakan untuk tahap selanjutnya (Tabel 1).

**Tabel 1. Hasil uji bebas etanol**

Identifikasi	Prosedur	Hasil
Uji bebas etanol	Ekstrak + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (p) + CH <sub>3</sub> COOH → dipanaskan	Tidak tercium bau ester

Ekstrak yang diperoleh selanjutnya diidentifikasi kandungan senyawanya. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa ekstrak positif mengandung saponin, tetapi negative

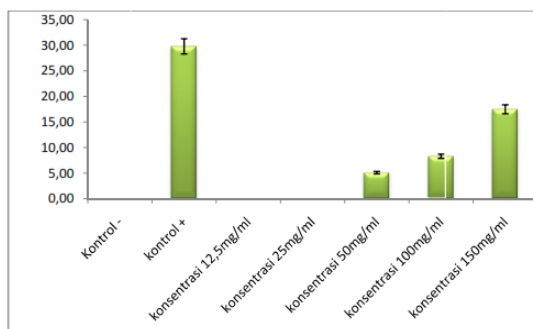
flavonoid. Selain itu, ekstrak juga diketahui mengandung polivenol tepatnya senyawa tannin (Tabel 2).

**Tabel 2. Hasil kandungan senyawa**

Identifikasi	Prosedur	Hasil
Saponin	Ekstrak + aquadest → dikocok sampai menimbulkan busa	+
Flavonoid	Ekstrak + etanol absolut + 2 tetes HCl (p) → dipanaskan diatas penangas selama 15 menit	+
Polivenol	Ekstrak + 5 tetes NaCl 10% dan disaring. Filtrate dibagi 3 bagian: A digunakan sebagai blanko, B	tannin terhidrolisa

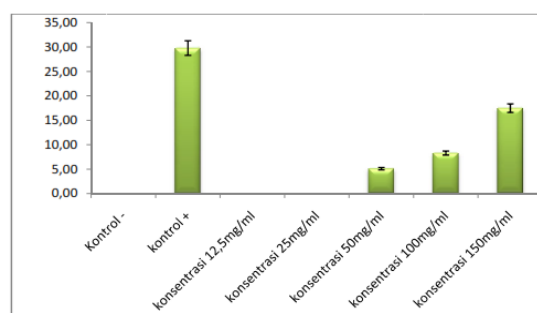
ditambah 3 tetes pereaksi  $\text{FeCl}_3$  C ditambah garam gelatin

Ekstrak yang diperoleh tersebut selanjutnya diuji aktivitas antibakterinya terhadap bakteri *Eschericia coli* dan *Staphylococcus aureus* dengan menggunakan metode Kirby bauer. Gambar 1 menunjukkan hasil daya hambat ekstrak tunas bambu terhadap bakteri *Eschericia coli*. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa aktivitas antibakteri ekstrak tunas bambu baik pada bakteri *Eschericia coli* mulai terlihat pada konsentrasi 50 mg/mL dan meningkat pada konsentrasi yang lebih tinggi.



Gambar 1. Hasil Daya Hambat Antibakteri *Eschericia coli*

Hasil yang sama juga ditunjukkan terhadap *Staphylococcus aureus*. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa aktivitas antibakteri ekstrak tunas bambu baik pada bakteri *Staphylococcus aureus* mulai terlihat pada konsentrasi 50 mg/mL dan meningkat pada konsentrasi yang lebih tinggi. Gambar 2 menunjukkan hasil daya hambat ekstrak tunas bambu terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*



Gambar 2. Hasil Daya Hambat Antibakteri *Staphylococcus aureus*

## PEMBAHASAN

Penelitian ini dilakukan untuk menguji daya antibakteri tunas bambu apus terhadap bakteri *Eschericia coli* dan *Staphylococcus aureus* secara in vitro. Tunas bambu apus dalam pengobatan tradisional berkhasiat sebagai obat demam dan peluruh air seni<sup>2</sup>. Bahan yang sudah di dapat dikumpulkan, lalu dicuci dan benar-benar bersih kemudian dilanjutkan dengan pengeringan. Pengeringan tunas bamboo apus sudah terlebih dahulu diiris tipis-tipis kemudian di oven  $\pm 400^\circ\text{C}$  selama 2 x 24 jam. Proses pengeringan ini dimaksudkan untuk mengurangi kadar air, pengurangan kadar air ini bertujuan untuk menghindari tumbuhnya jamur atau bakteri yang akan merusak simplisia, sehingga simplisia yang diperoleh tidak mudah rusak dan dapat disimpan dalam waktu yang cukup lama dan setelah kering, tunas bamboo apus di blender sampai didapatkan serbuk yang halus.

Ekstraksi tunas bambu apus menggunakan metode maserasi. Maserasi dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia dalam cairan penyari yang akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif. Perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif di dalam sel dengan yang di luar sel membuat larutan yang terpekat didesak keluar. Peristiwa tersebut berulang sampai terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan diluar sel dan di dalam sel<sup>8</sup>. Pelarut yang digunakan dalam maserasi ini adalah etanol 70% sebagai pelarut penyari. Tunas bambu apus mempunyai kandungan saponin, flavonoid, dan polifenol yang merupakan senyawa polar atau mudah larut air dan dapat

diekstraksi dengan etanol 70%<sup>9</sup>. Pelarut etanol 70% sangat efektif dalam menghasilkan jumlah bahan aktif yang optimal, dimana bahan penganggu hanya skala kecil yang turut ke dalam cairan pengekstraksi, etanol merupakan pelarut yang bersifat universal sehingga dapat menyari lebih banyak dibandingkan dengan pelarut lain. Pengadukan dalam proses ekstraksi bertujuan untuk mencapai keseimbangan konsentrasi bahan ekstraktif yang lebih cepat ke dalam cairan dan menghilangkan bahan pengekstrak maka dilakukan pemekatan dengan rotary evaporator<sup>10</sup>.

Hasil ekstrak tunas bambu apus diperoleh randemen 13,21% dari 200 gram simplisia tunas bambu apus dengan pelarut etanol 70%, kemudian dilakukan pengujian ekstrak yaitu uji kualitatif kandungan saponin, flavonoid, dan polifenol lalu uji bebas etanol. Uji kualitatif merupakan uji pendahuluan yang berfungsi untuk memastikan adanya kandungan fitokimia yang ada didalam tunas bambu apus. Uji Saponin pada penelitian menunjukkan hasil positif yang ditunjukkan melalui timbulnya busa. Busa yang terbentuk menunjukkan adanya glikosida yang mampu membentuk buih dalam air. Senyawa glikosida terhidrolisis menjadi glukosa dan aglikon<sup>6</sup>. Uji Flavonoid pada penelitian menunjukkan hasil positif dengan penambahan HCl untuk mendeteksi senyawa yang mengandung inti benzopiranon. Warna merah yang terbentuk pada flavonoid disebabkan karena terbentuknya garam flavilium<sup>6</sup>. Uji aktivitas antibakteri ekstrak tunas bambu apus yang diujikan pada bakteri *Escherichia coli* dan bakteri *Staphylococcus aureus* dilakukan dengan metode difusi agar untuk mengukur daya hambat. Ekstrak yang akan diuji diambil dengan cara mencelupkan kertas cakram kedalam konsentrasi ekstrak sehingga didapat zona hambat terhadap bakteri *Escherichia coli* dan

*Staphylococcus aureus*. Kelebihan kertas cakram adalah mudah dilakukan, tidak memerlukan peralatan khusus dan relatif murah<sup>4</sup>.

Diameter zona hambat terhadap bakteri tersebut sangat dipengaruhi oleh konsentrasi ekstrak. Pengukuran zona hambat antibakteri dapat dilihat dengan terbentuknya zona bening. Uji antibakteri ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 7 perlakuan dan setiap perlakuan terdiri atas 5 ulangan. Aquades steril digunakan sebagai pelarut dan sekaligus sebagai kontrol negatif yang digunakan untuk memastikan bahwa aquades steril sebagai kontrol negatif tidak memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*.

Kontrol positif dalam penelitian ini menggunakan ampicilin. Ampicilin merupakan antibiotik spektrum luas golongan penisilin yang paling umum digunakan<sup>12</sup>. Ampicilin adalah turunan penisilin yang tahan asam tetapi tidak tahan terhadap enzim penisilinase. Mekanisme kerja ampicilin adalah Menghambat sintesis dinding sel bakteri dengan mengikat satu atau lebih pada ikatan penisilin-protein, sehingga menyebabkan penghambatan pada tahapan akhir transpeptidase sintesis peptidoglikan dalam dinding sel bakteri, akibatnya biosintesis dinding sel terhambat dan sel bakteri menjadi pecah (lisis)<sup>13</sup>.

Konsentrasi dibuat 5 macam ekstrak yaitu 12,5 mg/ml, 25 mg/ml, 50 mg/ml, 100 mg/ml, 150 mg/ml yang diujikan ke media yang telah ditanami bakteri dengan bantuan kertas cakram dan setelah diinkubasi selama 24 jam, diukur zona hambatan yang terbentuk. Pengukuran diameter zona hambat menggunakan jangka sorong dan diperoleh diameter rata-rata daya hambat pada *Escherichia coli* konsentrasi 12,5mg/ml adalah 0,00; pada konsentrasi 25mg/ml adalah 8,54; pada konsentrasi 50mg/ml adalah

8,58; pada konsentrasi 100mg/ml adalah 9,74 dan pada konsentrasi 150mg/ml adalah 10,9. Diameter daya hambat *Staphylococcus aureus* yang ditunjukkan pada konsentrasi 12,5 mg/ml adalah 3,06; pada konsentrasi 25mg/ml adalah 3,3; pada konsentrasi 50mg/ml adalah 6,74; pada konsentrasi 100mg/ml adalah 7,94 dan pada konsentrasi 150mg/ml adalah 9,50. Hasil tersebut menunjukkan bahwa ekstrak tunas bambu apus mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*.

Uji statistik dengan menggunakan one way Anova didapat F hitung pada *Escherichia coli* sebesar 50.339 dan *Staphylococcus aureus* sebesar 152.180, harga signifikan sebesar 0.00 kurang dari signifikansi yang ditentukan yaitu 0,05. Hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa ekstrak tunas bambu apus mempunyai aktivitas antibakteri, selanjutnya dilakukan uji ANOVA dan uji Kruskal walis untuk mengetahui bahwa adanya perbedaan dari data tersebut.

Hasil di atas dapat dilihat bahwa aktivitas antibakteri tunas bambu apus terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* mempunyai daya hambat dengan konsentrasi maksimal 150 mg/ml, dengan demikian dapat dikatakan bahwa daya antibiotika dipengaruhi oleh konsentrasi. Konsentrasi semakin besar akan menyebabkan daya hambat terhadap bakteri uji juga besar<sup>14</sup>.

Mekanisme kerja flavonoid sebagai antibakteri dapat membentuk kompleks dengan protein ekstraseluler dan dinding sel bakteri, selain itu flavonoid bersifat lipofilik yang dapat merusak membran mikroba<sup>15</sup>. Tannin juga memiliki mekanisme kerja sebagai antibakteri, tannin bersifat astrigen (zat yang dapat menciutkan). Tannin mampu merusak membran sel dengan mengikat ion-

ion logam seperti Cu dan Fe. Saponin sebagai antibakteri mengandung zat yang mampu menghemolisis sel darah<sup>16</sup>. Membran sel darah menyerupai membran sel pada bakteri sehingga proses yang terjadi pada sel bakteri sama seperti yang terjadi oleh sel darah.

## SIMPULAN

1. Ekstrak Tunas bambu apus mempunyai aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*.
2. Ekstrak Tunas bambu apus yang paling efektif sebagai antibakteri bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* adalah konsentrasi 150 mg/ml.

## SARAN

Perlu dilakukan penelitian tentang uji aktivitas ekstrak tunas bambu apus terhadap bakteri lainnya, dengan metode lain dan mencari senyawa aktif lainnya dalam tanaman tunas bambu apus.

## REFERENSI

1. Andoko, A. 2007. *Budidaya Bambu Rebung*. Penerbit Kasinus. Yogyakarta.
2. Singhal, P., Bal, L. M., Satya, S., Sudhakar, P., dan Naik, S. N. 2013. Bamboo Shoots: A Novel Source of Nutrition and Medicine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 53(5).
3. Croxen M., Law R.J., Scholz R., Keeney K.M., Wlodarska M, dan Finlay B.B. 2013. Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Review* 26 (4).
4. Otto, M. 2013. Staphylococcal Infections: Mechanisms of Biofilm Maturation and Detachment as Critical Determinants of Pathogenicity\*. *Annual Review of Medicine Annu. Rev. Med.* 64(1).

- 
5. Zhang, Y., Wu, X., Ren, Y., Fu, J., & Zhang, Y. 2004. Safety Evaluation of a Triterpenoid-Rich Extract from Bamboo Shavings. *Food and Chemical Toxicology* 42(11)
  6. Samsumaharto, R.A. 2009. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak N-Heksan, Etil Asetat Dan Etanol 70 % Daun Rosella (*Hibiscus Sabdariffa* L) terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi. Surakarta.
  7. Mustarichie., 2011. *Penelitian Kimia Tanaman Obat*. Cetakan Pertama, Bandung.
  8. Zanbar, A. 2005. *Ilmu Statistik*. Cetakan Pertama. Rekayasa Sains Bandung. Bandung,
  9. Depkes.R.I, 1979. *Farmakope Indonesia, edisi ketiga*, Jakarta.
  10. Harborne, J.B. 1996. *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Penerbit ITB. Bandung.
  11. Voigt, R. 1994. Buku Pelajaran Teknologi Farmasi, edisi ke-5, Gajha Mada University Press. Yogyakarta.
  12. Lewis, K. 2013. Platforms for antibiotic discovery. *Nature Reviews Drug Discovery Nat Rev Drug Discov* 12(5).
  13. Peach, K. C., Bray, W. M., Winslow, D., Linington, P. F., & Linington, R. G. 2013. Mechanism of action-based Classification of Antibiotics Using High-Content Bacterial Image Analysis. *Mol. BioSyst. Molecular BioSystems* 9(7).
  14. Bernier, S. P., & Surette, M. G. 2013. Concentration-dependent activity in natural environments. *Front. Microbio. Frontiers in Microbiology* 4
  15. Romano, B., Pagano, E., Montanaro, V., Fortunato, A. L., Milic, N., & Borrelli, F. 2013. Novel Insights into the Pharmacology of Flavonoids. *Phytother. Res. Phytotherapy Research* 27(11)
  16. Lorent, J. H., Quetin-Leclercq, J., & Mingeot-Leclercq, M. 2014. The Amphiphilic Nature of Saponins and Their Effects on Artificial and Biological Membranes and Potential Consequences for Red Blood and Cancer Cells. *Org. Biomol. Chem.* 12(44)